中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）47(3)：267～282（1998）

微衛星 DNA 與逢機增殖多型性 DNA 在番椒同種內種原鑑定之利用及比較[1]

王昭月[2]　范明仁[2]

摘要：本研究以源自歐洲、亞洲、北美、南美洲及澳洲等地區 16 個栽培國家的 90 個番椒（*C. annuum*）種原，探討以微衛星 DNA（microsatellite DNA：ISSR）與逢機增殖多型性DNA（random amplified polymorphic DNA, RAPD）分子標誌，進行不同來源地區的同『種』內番椒種原之鑑別，並估測其歧異性。試驗結果顯示 ISSR 分析，可自 5 個引子的聚合酵素連鎖反應（polymerase chain reaction，PCR）產物中，獲得 151 個多型性片段；以 RAPD 分析時，自 5 個引子的產物中，則可獲得 130 個多型性片段。將 ISSR 或 RAPD 標誌的 5 個引子合併分析結果，均可使同『種』內 90 個品系完全鑑別。唯 ISSR 內單一引子 SCRI 1418 具有指紋比對之效力，可將同『種』內 90 個種原完全鑑別。以 ISSR分析並估測不同來源地區番椒種原之歧異性，結果以澳洲種原之相似性係數爲 0.68 最低，其次爲瓜地馬拉種原之 0.73，最高爲義大利種原之 0.82；以RAPD 標誌估測不同來源地區番椒種原之歧異性，結果也以澳洲種原之相似性係數 0.67 最低，而以義大利及土耳其等地區種原之相似係數 0.82 爲最高。試驗結果顯示，利用 ISSR 或 RAPD 分析均可標誌同『種』內不同種原之多型性，且對於不同來源地區種原之歧異性之估測亦有相似之結果。此兩種分子分析標誌均爲簡單、省時又具效率之種原鑑定方式。

關鍵詞：微衛星 DNA、逢機增殖多型性 DNA、種原鑑定、番椒。

前　言

經歷長程的人爲選拔與育種，俾使多數地方種或傳統栽培種逐漸喪失原有的種原歧異性。但爲了不斷再適應變遷中的生態環境及長遠的農業生產目標，人類除積極保育現存的野生或馴化植物資源以應不時之需外，對潛藏於種原中的抗病性、耐逆境或特殊品質特性基因的篩選與遺傳評估，將同爲農業研究上重要的一環。

自 Kary Mullis（1984）提出 PCR （polymerase chain reaction）技術後，利用 DNA 層次的分子生物標誌，已廣泛被利用於種原（品種)鑑定或植物育種計畫上後裔遺傳之評估；另外對於種原演進，相似保存性等探討也視爲一項有效的工具之一。分子生物標誌較傳統之植物性狀更具準確與快速性[14]。自 1990 年 Welsh[19] 及 William[20] 提出操作簡單的 RAPD 分析技術（random amplified polymophic DNA)，至今在水稻[11]、十字花科蔬菜[8,9]、馬鈴薯[6]、桃[2]、菊花[21]及康乃馨[15]等多數作物利用 RAPD 進行種原鑑別或特定性狀基因分析研究上，均有報導。而與 RAPD 同期發展的 PCR 分子標誌技術中的微衛星 DNA（microsatellite DNA）分析，也是一種較簡單且有效率的種原分析方法。微衛星 DNA 分

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1952 號。
2. 本所作物種原室助理研究員、研究員兼主任。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

析可追溯至 Tautz 等人(1984)首先在哺乳類動物的基因組上發現 1～6 個核甘酸重覆性短序列（short tandem repeat）[17]，而後 Condit（1991），Akkaya（1992）及 Wang（1994）等人又陸續提出，稱之爲 simple sequence repeat(SSR)，此同樣存在植物上，且有明顯的多型性表現[1,4,18]。1993 年迄今，微衛星 DNA 分析已成功利用於水稻基因圖譜[22]，大豆基因型研究[14]，玉米的種原分析[16]。初期的微衛星 DNA 分析，係由各作物 DNA 資料庫中，搜尋出現頻度高的 SSR 序列，合成該引子，再針對特定作物進行 PCR 多型性分析[13,16]。至 1995 年 Kantety 進一步提出 inter-simple-sequence- repeat （ISSR），利用於玉米遺傳歧異度分析[7]。Charters（1996）以 ISSR markers 可完全鑑別油菜栽培種[3]。Ratnaparkhe（1998）也以 ISSR 標誌小黎豆抗鐮刀菌萎凋病（*Fusarium* wilt）基因[13]，使得 ISSR 已有更多實用化之研究。

番椒（*Capsicum spp*. Pepper）爲茄科三大作物之一，僅次於馬鈴薯、番茄。亞洲地區生產約占全球半數，其主要經濟栽培幾乎都屬於 *C. annuum*，其包含所有甜椒及大多數辣椒。據 1995 年亞洲蔬菜研究發展中心（AVRDC）統計，現保存 6000 份種原中 *C. annuum* 至少占 60%，未分類占 23%，其餘野生馴化種原尙未及 20%，故 *C. annuum* 重要性可見一斑。唯 *C. annuum* 種內相似性高，除部分可於開花結果晚期分辨外，常無法自植株型態上鑑別每一品系。鑑於育種栽培時，能有更快速、詳實的種原遺傳背景資料，擬於本研究比較利用微衛星 DNA（ISSR）及 RAPD 標誌 在『種』內鑑別之可行性。

材料與方法

一、植物材料

取自亞洲蔬菜研究發展中心，蒐集得 90 個番椒種原（*C. annuum*），含甜椒、辣椒二類。各品系來源地包括歐洲、亞洲、北美、南美洲及澳洲等地區，其中含主要栽培國家有中國大陸、韓國、義大利等 16 個國家（表 1）。

表 1. 試驗之番椒種原

Table 1. Accessions of pepper (*Capsicum annuum*) germplasm used for experiment

Order number	P.I. Number	Country of origin	Order number	P.I. Number	Country of origin
1	C02409	Australia	20	C01122	Germany
2	C02413	Australia	21	C01242	Germany
3	C02408	Australia	22	C00790	Germany
4	C02410	Australia	23	C01155	Germany
5	C02411	Australia	24	C03860	Guatemala
6	C02412	Australia	25	C00881	Guatemala
7	C02415	Australia	26	C01255	Guatemala
8	C00701	Bulgaria	27	C02542	Guatemala
9	C00716	Bulgaria	28	C02673	Guatemala
10	C00745	Bulgaria	29	C03854	Guatemala
11	C02741A	Brazil	30	C03855	Guatemala
12	C02741B	Brazil	31	C03856	Guatemala
13	C03764	Brazil	32	C03951	Guatemala
14	C03773	Brazil	33	C00712	Hungary
15	C00772	China	34	C00839	Hungary
16	C01239	China	35	C00868	Hungary
17	C01413	China	36	C01203	Hungary
18	C01477	China	37	C00963	Italy
19	C01121	Germany	38	C00766	Italy

（續表 1.）

39	C00785	Italy	65	C03640	Malaysia
40	C00787	Italy	66	C00812B	Netherlands
41	C03961	Japan	67	C00931	Netherlands
42	C00833	Japan	68	C01311	Netherlands
43	C01454	Japan	69	C00784	Netherlands
44	C01487	Japan	70	C00867	Netherlands
45	C01540	Japan	71	C00703	USSR
46	C01026	Korea	72	C00693	USSR
47	C01674	Korea	73	C00715	USSR
48	C01675	Korea	74	C01132	USSR
49	C01676	Korea	75	C01562	USSR
50	C03831	Korea	76	C03033	Turkey
51	C03832	Korea	77	C02684	Turkey
52	C03833	Korea	78	C03016	Turkey
53	C01315	Mexican	79	C03085	Turkey
54	C02484	Mexican	80	C03018	Turkey
55	C02485	Mexican	81	C03140	Turkey
56	C02996	Mexican	82	C00707	USA
57	C03834	Mexican	83	C00767	USA
58	C03837	Mexican	84	C00801	USA
59	C03838	Mexican	85	C00829	USA
60	C03448	Malaysia	86	C00832	USA
61	C03464	Malaysia	87	C00845	USA
62	C03468	Malaysia	88	C00751	USA
63	C03471	Malaysia	89	C00788	USA
64	C03472	Malaysia	90	C01961	USA

二、DNA 萃取

取植株嫩葉 0.3 公克加入液態氮磨碎，後加入 500 µl 的 DNA 萃取緩衝液（2%(w/v) CTAB，100 mM Tris-HCl ，pH 8.0; 20 mM EDTA ；1.4 M NaCl ; 0.2%（v/v） β-mercaptoethenol），再放入 60℃水浴 30 分鐘，輕輕混勻後加入 500 µl chloroform-isomamyl alcohol （24：1 , v/v ） ，再混合均勻以 4℃ 14,000rpm離心 10 分鐘。取上清液加入 300 µl 之冰冷 isopropanol，混合均勻後放置在室溫下沉澱 1 小時（或 -20℃，隔夜）。再離心去上清液，再加入 1 ml 的 washing buffer (76% ethanol (v/v); 10 mM ammonium acetate) 輕輕混勻後，再於 4℃ 下以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，再去上清液將沉澱的 DNA 置於無菌操作台風乾。風乾的 DNA 溶於 50µl 的無菌水再加入 RNase（10 µg/ml）在 37℃ 下反應 20 分鐘。最後取 10 µl 的 DNA 溶液，稀釋 100 倍並測定 OD 260 nm 之讀值，及計算 DNA 含量濃度。

三、聚合酵素連鎖反應（Polymerase Chain Reaction，PCR)

1. RAPD 分析：

將萃取得之 genomic DNA 稀釋成 5 ng/µl 放置在 -20℃ 下，提供聚合酵素連鎖反應時，作爲模板 DNA。自 UBC RAPD primer set 取 100/4 及 100/5 共二組 200 種引子，及 Operon KitA（O、P、Q、R、S）與 KitB 共 120 種引子，經初步試驗，由 PCR 產物中篩選出多型性明顯的引子 5 個：UBC 313 , UBC 327 , UBC 457 , OPB1，OPB10），進行 90 個品系的聚合酵素連鎖反應。反應液總體積爲 25µl，內含 1 u Taq polymerase （Promega）、1×PCR buffer （50 mM KCl ；10 mM Tris-HCl，pH 9.0；0.1% Triton 100)、2.5 mM MgCl2、200 µM dNTP、0.2 µM primer 及 50 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器爲 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 960，反應溫度條件設定如下： 94℃ 3 分鐘，41℃ 1 分鐘，72℃ 1 分鐘；再進行 43 次的 94℃ 1 分鐘，41℃ 1 分鐘，72℃ 2 分鐘；最後 72℃ 5 分鐘。反應完成後貯藏在 4℃。

2. ISSR 分析：

ISSR分析之聚合酵素連鎖反應的DNA材料與反應液體積濃度與RAPD分析相同，唯ISSR反應用引子則取自 UBC Kit 及水稻、玉米基因組中的 ISSR primers，共計 72 條。經初步試驗篩選出 5 種多型性明顯的引子：Y6A，Y6S，UBC886，UBC887，SCRI1418。PCR 反應儀器與 RAPD 分析相同，反應溫度則設定為：94℃ 3 分鐘，50℃ 1 分鐘，72℃ 1 分鐘；再進行 43 次的 94℃ 1 分鐘，50℃ 1 分鐘，72℃ 2 分鐘；最後 72℃ 5 分鐘。反應完成後貯藏在 4℃。

四、DNA 電泳

經聚合酵素連鎖反應而增殖之 DNA，取 12μl 加入 6 倍的電泳緩衝液（6×loading buffer：0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol，40% w/v sucrose），而 RAPD 分析係在 2.5% 的 agarose 以 TAE buffer（40 mM Tris acetate，pH 8.0；1 mM EDTA）進行 DNA 電泳；ISSR 分析則以 3 % MetaPhor agarose（MetaPhor：SeaKem LE = 1：1），電泳液為 TBE。電泳槽為 Cosmo, Mupid-2，電壓 100 伏特，電泳時間約 25 分鐘，結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 中染色 20-30 分鐘，再置於 UV 光箱中，檢視膠體上 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation) 進行分析。

五、資料分析

群集分析是採用 Gel-Compar 軟體，計算兩品系間所有分析的 RAPD 或 ISSR 條帶中相同條帶的比率。所有樣品兩兩分析後，以 UPGMA（Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical）估算相似性程度。PCR 產物的 DNA 片段係以 Bio100 DNA Ladder（3000bp00bp）作為估算分子量。並以 Dice's 相似性係數分析，相似性係數値（simple matching coefficient）的計算方式為 F=2nxy/nx+ny。nx 及 ny 分別代表 X 及 Y 品系的所有多型性 DNA 片段，nxy 則表示 X 及 Y 品系間都共有的片段數（simple matching coefficient, Nei & Li 1979）[10]，再於 Digital 個人電腦中以 Gel-Compar 軟體進行 UPGMA 群體分析，估算品系間遺傳相似程度（similarity coefficient）。

結　果

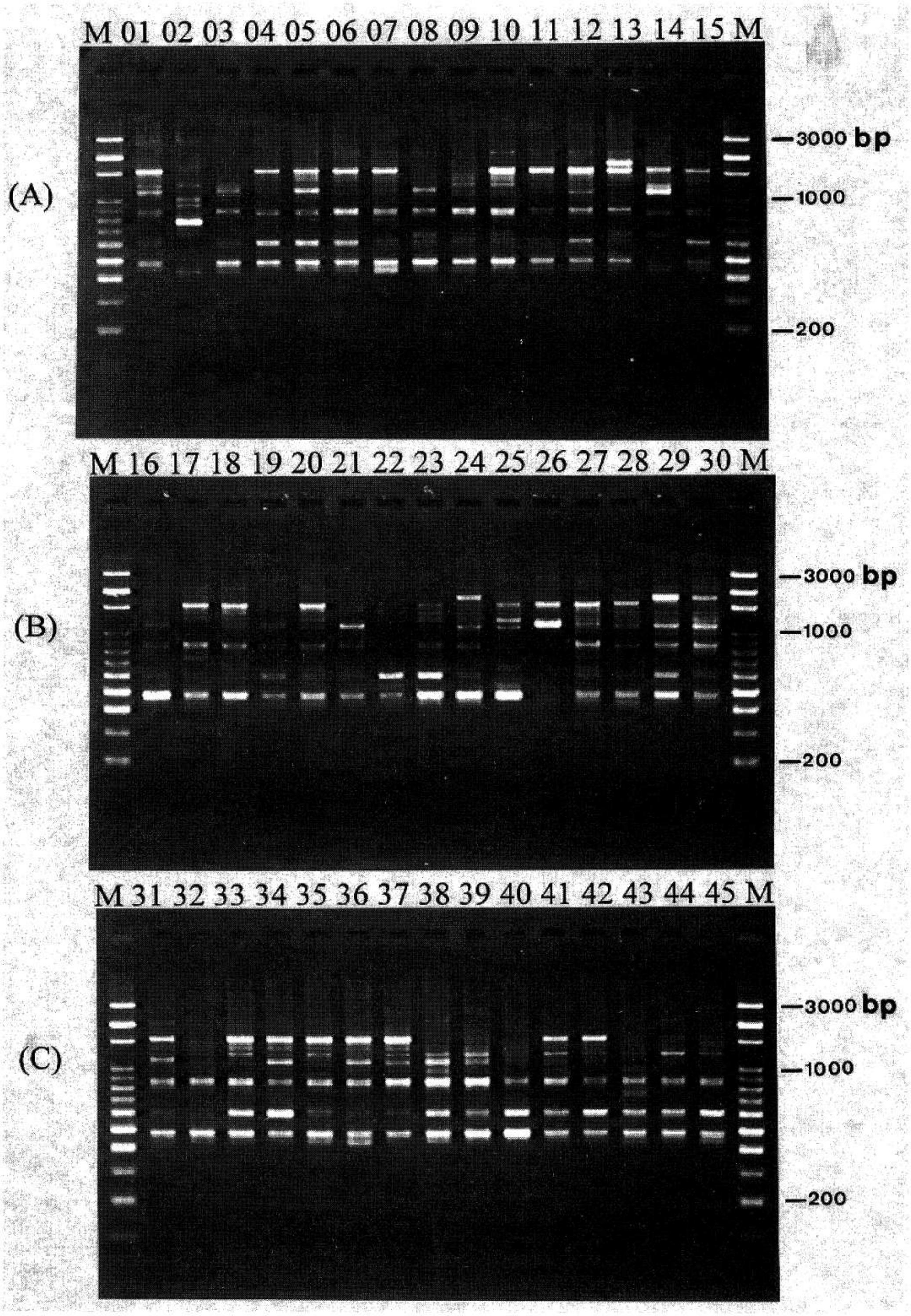
一、番椒（*C. annuum*）種原之 RAPD 分析

自 PCR 產物篩選多型性表現明顯的 RAPD 引子 5 個：UBC313，UBC327，UBC457，OPB1，OPB 10（表 2），進行 90 個 *C. annuum* 種內種原鑑定之結果顯示，以 OPB1 與 OPB10 二個引子所產生的多型性片段比率最高，其中 OPB1 產生的 26 個 RAPD markers，均呈現明顯多型性（表 2，圖 1）。總計 5 個 RAPD 引子共可產生 134 個 RAPD 條帶，其中 130 個具條帶有多型性，平均每個引子產生 27 個 RAPD 條帶。產生的 RAPD 條帶分子量大小則介於 273bp 至 2,811bp（表 2）。

表 2. 具有多型性之 RAPD 引子及其多型性特性

Table 2. Characteristics of polymorphic RAPD primer

Primers	Sequence	Product Size (bp)	No. of Fragments	Polymorphic Fragments	Polymorphic Index (%)
UBC 313	5' ACGGCAGTGG3'	273-1,961	19	17	89
UBC 327	5' ATACGGCGTC3'	289-1,926	32	31	97
UBC 957	5' CGACGCCCTG3'	334-2,344	33	32	97
OPB 1	5' GTTTCGCTCC3'	445-2,811	26	26	100
OPB 10	5' CTGCTGGGAC3'	295-2,184	24	24	100
Total			134	130	-
Average			27	26	96


M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 M
(A)
—3000 bp
—1000
—200
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M
(B)
—3000 bp
—1000
—200
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M
(C)
—3000 bp
—1000
—200

（接下頁）

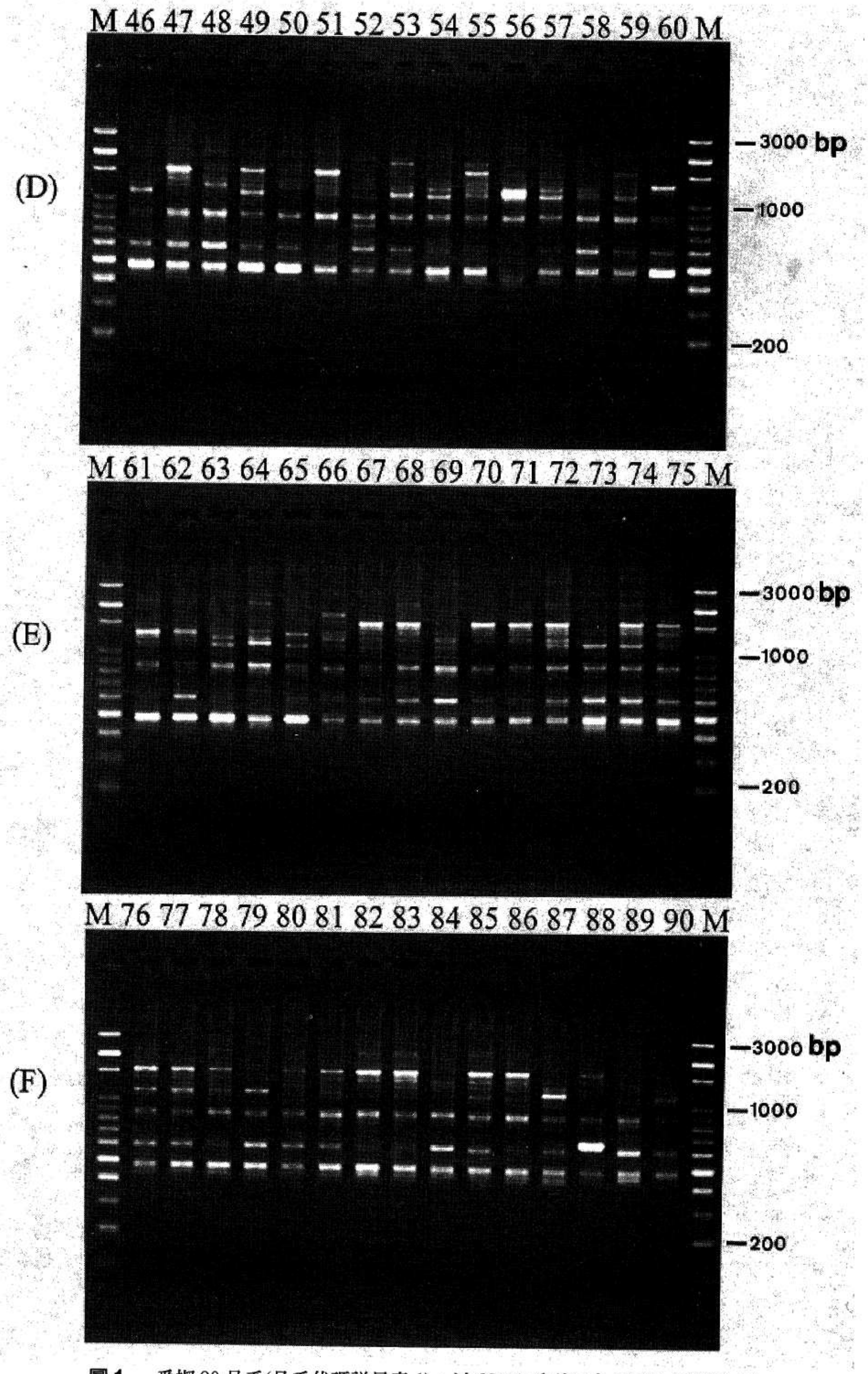


圖 1. 番椒 90 品系(品系代碼詳見表 1)，以 OPB1 爲引子之 RAPD 圖譜(A~F)

Fig.1. RAPD profiles (A~F) generated by primer OPB1 and resolved by 2.5% agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table 1.

將 5 個 RAPD 引子所產生的 134 個 RAPD 條帶，合併進行 UPGMA 群集分析。試驗分析結果顯示，供試的 90 個品系之遺傳相似性係數最遠爲 0.67（圖 2，表 4），其中以來自澳洲的 7 個品系，巴西的 4 個品系及瓜地馬拉的 9 個品系等三地區種原間的相似性係數最低，介於 0.67～0.7 之間；而來自保加利亞的 3 個品系、荷蘭的 5 個品系及土耳其的 6 個品系等地區番椒種原之相似性係數較高，約爲 0.82～0.83。整體而言，供試的 90 個番椒種原間相似性係數值在 0.67 至 0.95 之間，而各不同地區之種原相似值則介於 0.67 至 0.82（圖 2，表 4）。

二、番椒（C. annuum）種原之 ISSR 分析

自 PCR 產物中篩選有明顯多型性表現的 ISSR 引子 5 個：Y6A、Y6S、UBC 886、UBC 887 、SCRI 1418（表 3，圖 3、圖 4），進行 90 個 *C. annuum* 種內種原鑑定之結果顯示，以 SCRI 1418 引子所產生的 DNA 多型性比率最高爲 98%（表 3）；而 PCR 產生的片段又以 Y6A 及 SCRI 1418 兩個引子最多，分別各爲 44 個條帶及 40 個條帶。唯引子 SCRI 1418 反應產物中發現，產生的條帶具有指紋比對（finger printing）的效果，供試的 90 個品系均可以此引子予以鑑別。綜合 5 個 ISSR 引子，計可產生 165 個條帶，其中 151 個條帶有多型性，平均多型性比率達 91%。供試的 5 個 ISSR 引子，平均每個引子可產生 33 個條帶，而此 PCR 產物(條帶)的分子量大小則介於 175 bp 至 2,340 bp 間（表 3）。

將 5 個 ISSR 引子進行 PCR 產生的 165 個條帶，合併以 UPGMA 群集分析結果顯示，供試的 90 個品系其遺傳相似性係數最低爲 0.68（圖 5、表 4），其中仍以來自澳洲的 7 個品系間的相似性係數最小，爲 0.68；其次來自瓜地馬拉之 9 品系、韓國的 7 個品系間的相似性係數 0.73；土耳其的 6 個品系間的相似性係數 0.78；來自義大利的 4 個品系間的相似性係數最高，爲 0.82。整體而言，供試的 90 個番椒種原相似性係數值在 0.68 至 0.95 之間，而源自各不同地區之種原相似值則介於 0.68 至 0.82（圖 5、表 4）。

討　論

爲深入探討番椒種原種間遺傳相似性及評估地域性種原演化歧異度，Conicella（1989）利用酯酵素（esterase）之同功異構酵素的差異，探討不同地區來源之番椒（*Capsicum annuum* L.），結果以esterase 同功異構酵素圖譜分爲 A、B、C 三型：種原來自美國南部者依不同區可分屬 A、B 二型；墨西哥地區全屬 A 型；中美洲全屬 B 型；南美洲的秘魯爲 B 型；哥倫比亞 C 型，由此推論番椒是以中南美洲（玻利維亞）爲其核心起源中心，而後傳至北美、歐洲等處。故在中南美洲各地區，可散見不同類型之種原，而大量栽培的美國南部則因自各處引進種原，集大成而有雜聚現象[5]。唯利用酵素電泳可資提供的標誌基因較少，環境對材料的干擾也容易影響分析結果，因此無法將大量相似的種原再作更進一步精確分群。而近代 PCR 技術快速發展，植物種原多已深入 DNA 層次作更詳盡的分析。Prince 等人（1995）利用 RAPD 分析 21 個源自不同地區之不同種的番椒品系，結果發現產生的多型性 DNA 片段，可清楚的作爲品種間 DNA 指紋比對 (DNA fingerprinting)，且這些 PCR 增殖的 DNA 多型性片段，經 UPGMA 的群集分析 (cluster analysis)，又可清楚的將 21 品系分成四群，其中依『種』的分別將 *C. annuum*、*C. frutescens* 與 *C. baccatum* 三個種，明顯分成三個連鎖的群集[12]，但對相似性很高的同種內種原，尚未作進一步探討。綜合本研究結果證實，以 RAPD 或微衛星 DNA 應用於番椒種內種原鑑定均具有很高的多型性表現，兩種分析結果對於同『種』內族群之相似性評估也有相近的結果（圖 2、圖 5）。然而利用微衛星 DNA 進行 PCR 所增殖的多型性片段數目平均較高於以 RAPD markers 分析者（表 2、3），因此可提供作爲 finger printing 或作品系間鑑別的標誌也可能相對較 RAPD 多。進一步比較 RAPD 與微衛星 DNA 在種原分析上的效率，發現 RAPD 較容易產生人爲因素差異，故須留意試驗結果的再現性[7]。而早期標準的微衛星 DNA 分析，則在進行 PCR 反應前，須對存在該作物的 SSR 基因序列詳知，以確保正確地由此重覆序列增殖，此對於直接將微衛星 DNA 應用於植物育種

，成爲較費事而不易推行的方法。目前利用 ISSR （inter-simple- sequence -repeat）分析，可快速鑑別遺傳上極相似的種原，而且無須知道基因組的序列，故是爲一種簡便有效率又可直接用於偵測種原多型性之標誌方式。唯綜合本試驗結果證實以 RAPD 及微衛星 DNA 標誌方式確實均可應用於同『種』內一群遺傳很相近的種原鑑定、種原相似性估測或品系間遺傳歧異性之探討。

表 3. 具有多型性之 ISSR 引子及其多型性特性

Table 3. Characteristics of polymorphic ISSR primer

ISSR ID	Sequence sequence	Product Size (bp)	No. of Fragments	Polymorphic Fragments	Polymorphic Index (%)
Y6A	AATTCAAACACGCC-TCCCGAGTG	175-1,831	44	42	95
Y6S	ATATGCATTGCCTGG-AACTGGAAGGA	194-1,890	36	34	94
UBC 886	VBV(CT)^7	301-1,678	25	19	76
UBC 887	DVD(TC)^7	347-2,349	20	17	85
SCRI1418	BVB(GATA)^4	201-2,334	40	39	98
Total			165	151	-
Average			33	30	91

表 4. 不同來源的番椒種原以 RAPD 或 ISSR 標誌經 UPGMA 群集分析之相似性係數

Table 4. The Similarity coefficient of pepper (*Capsicum annuum*) germplasm from different countries, generated by ISSR or RAPD markers, and calculated from UPGMA cluster analysis

Country	Number. of Accessions	Similarity Coefficient by RAPD markers	Similarity Coefficient by ISSR markers
Australia	7	0.67	0.68
Bulgaria	3	0.82	0.77
Brazil	4	0.70	0.76
China	4	0.80	0.78
Germany	5	0.74	0.79
Guatemala	9	0.70	0.73
Hungary	4	0.77	0.79
Italy	4	0.82	0.82
Japan	5	0.79	0.79
Korea	7	0.77	0.73
Mexican	7	0.77	0.78
Malaysia	6	0.79	0.78
Netherlands	5	0.82	0.73
USSR	5	0.82	0.77
Turkey	6	0.82	0.78
USA	9	0.74	0.78

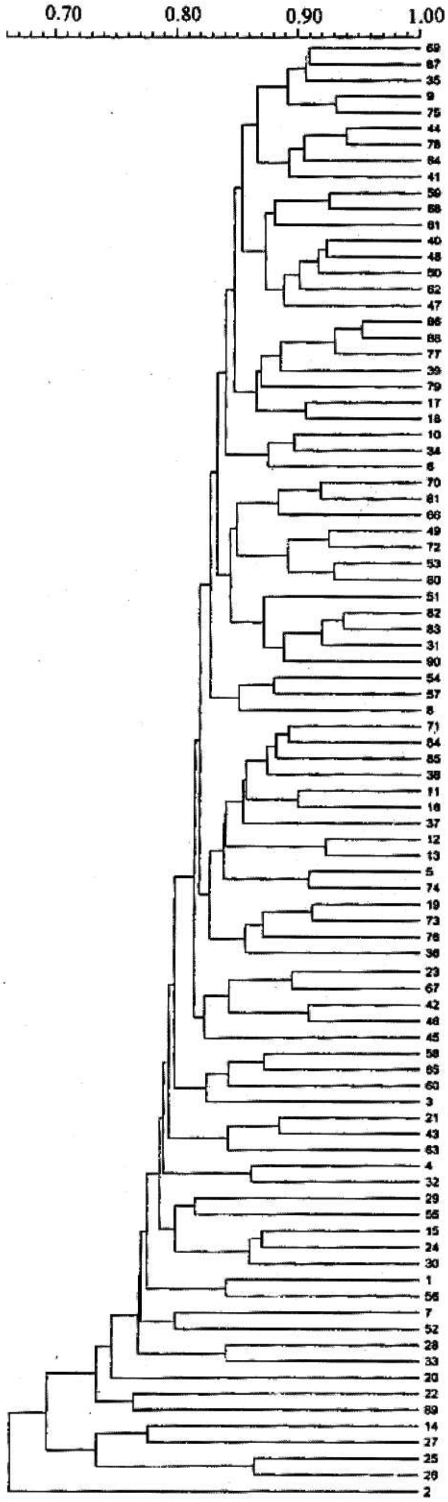
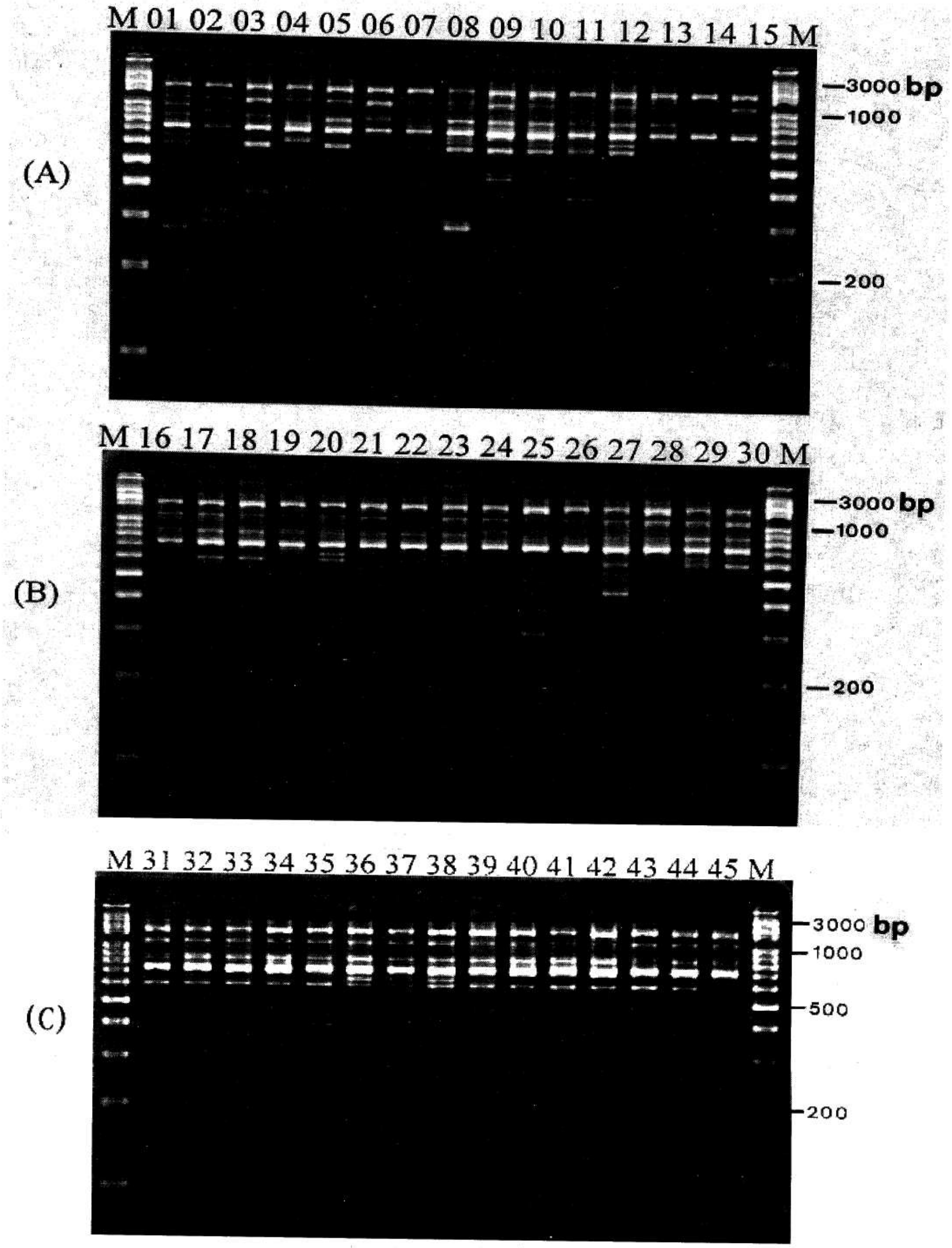


圖 2. 番椒 90 品系之 RAPD 圖譜，經 UPGMA Dice's 計算之相似性樹狀圖(品系代碼詳見表 1)

Fig. 2. Dendrogram illustrating genetic relationship among 90 pepper accessions, generated by UPGMA cluster analysis calculated from 134 RAPD markers produced by five primers. The scale on the top is Dice's coefficient of similarity (Numbers on right side of dendrogram refer to accessions list in Table 1)


M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 M
3000 bp
1000
200
(A)
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M
3000 bp
1000
200
(B)
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M
3000 bp
1000
500
200
(C)

（接下頁）

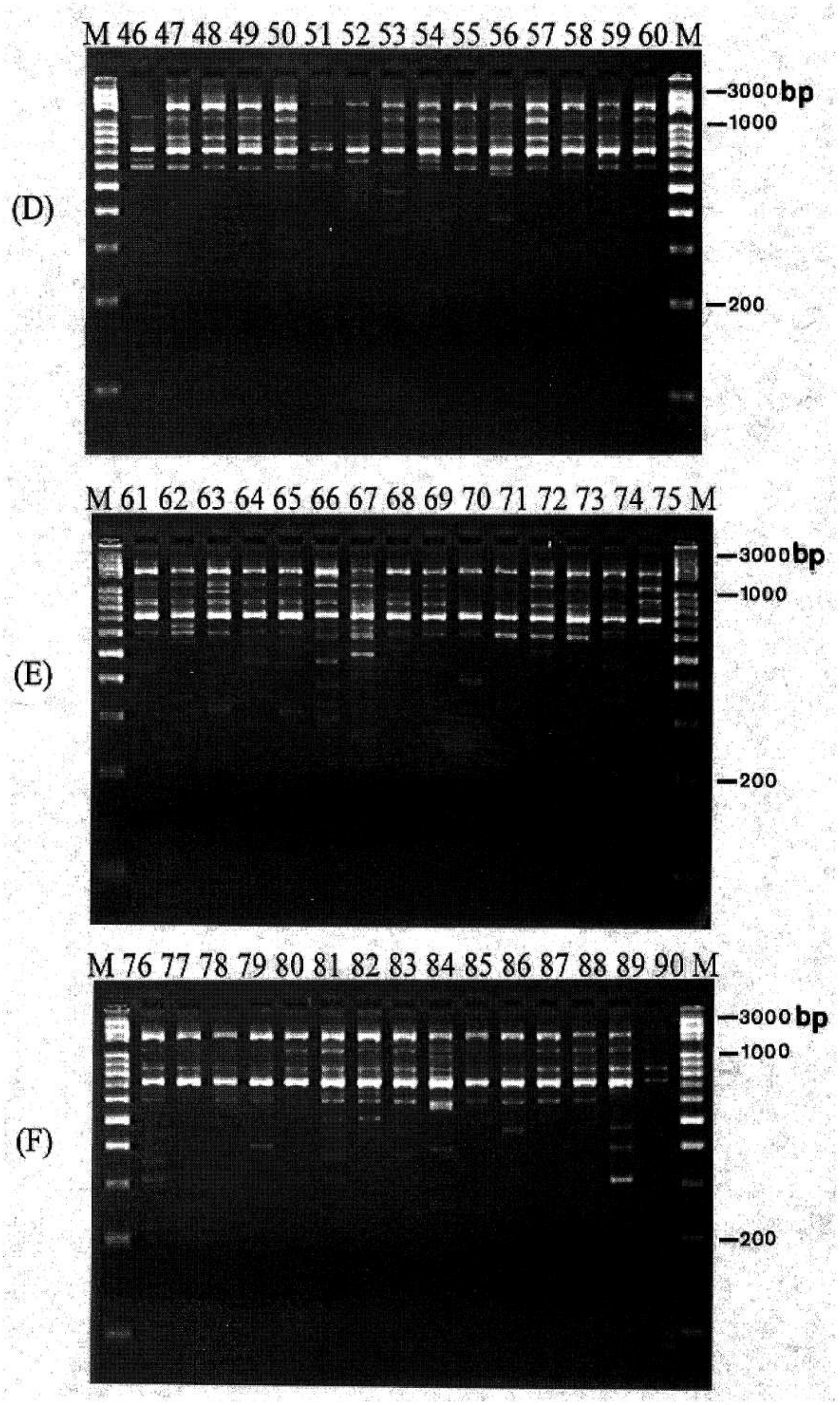
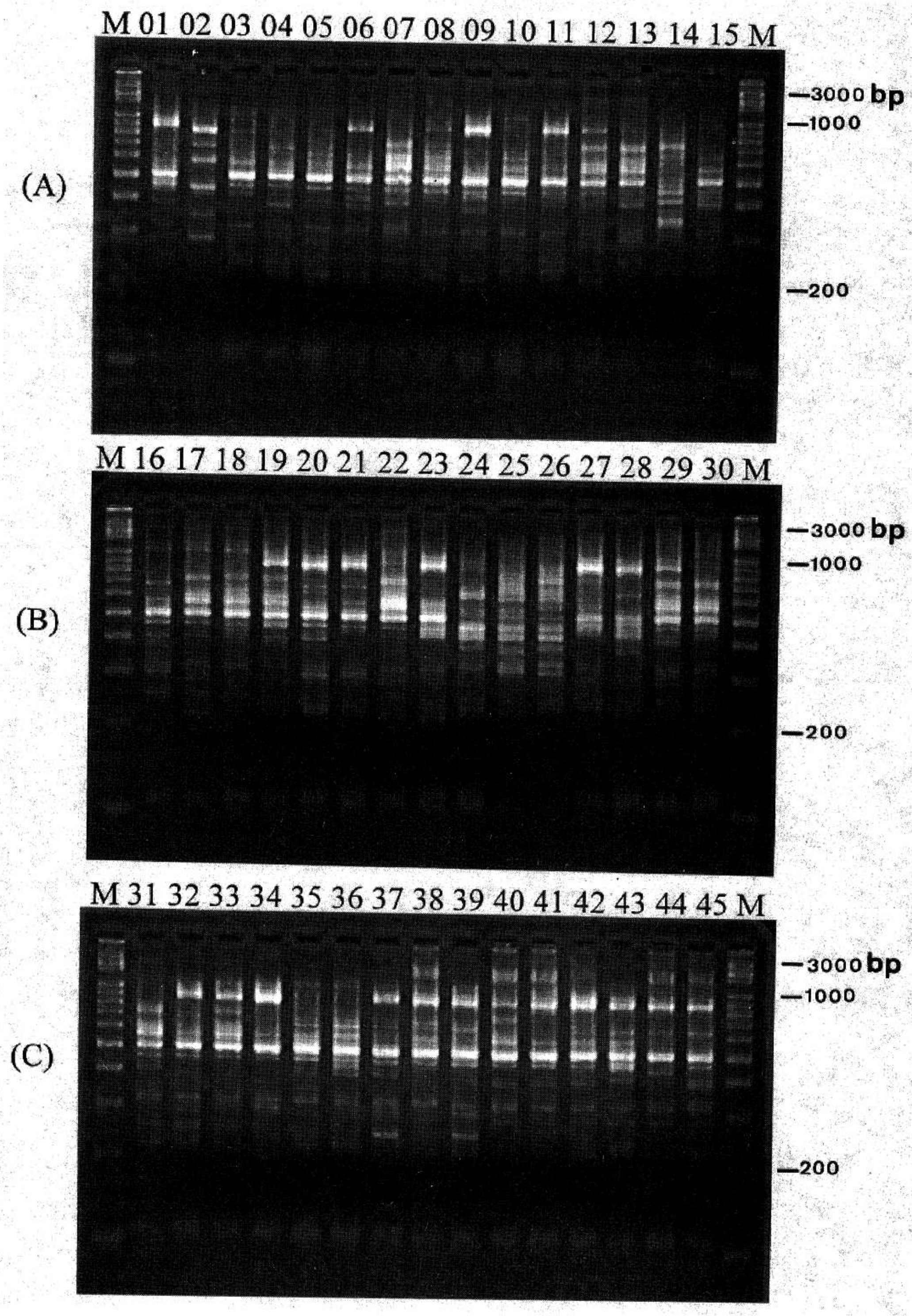


圖 3. 番椒 90 品系(品系代碼詳見表 1)，以 Y6S 為引子之 ISSR 圖譜(A～F)

Fig.3. ISSR profiles (A~F) generated by primer Y6S and resolved by 3% MetaPhor agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table 1.


M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 M
(A)
—3000 bp
—1000
—200
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M
(B)
—3000 bp
—1000
—200
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M
(C)
—3000 bp
—1000
—200

（接下頁）

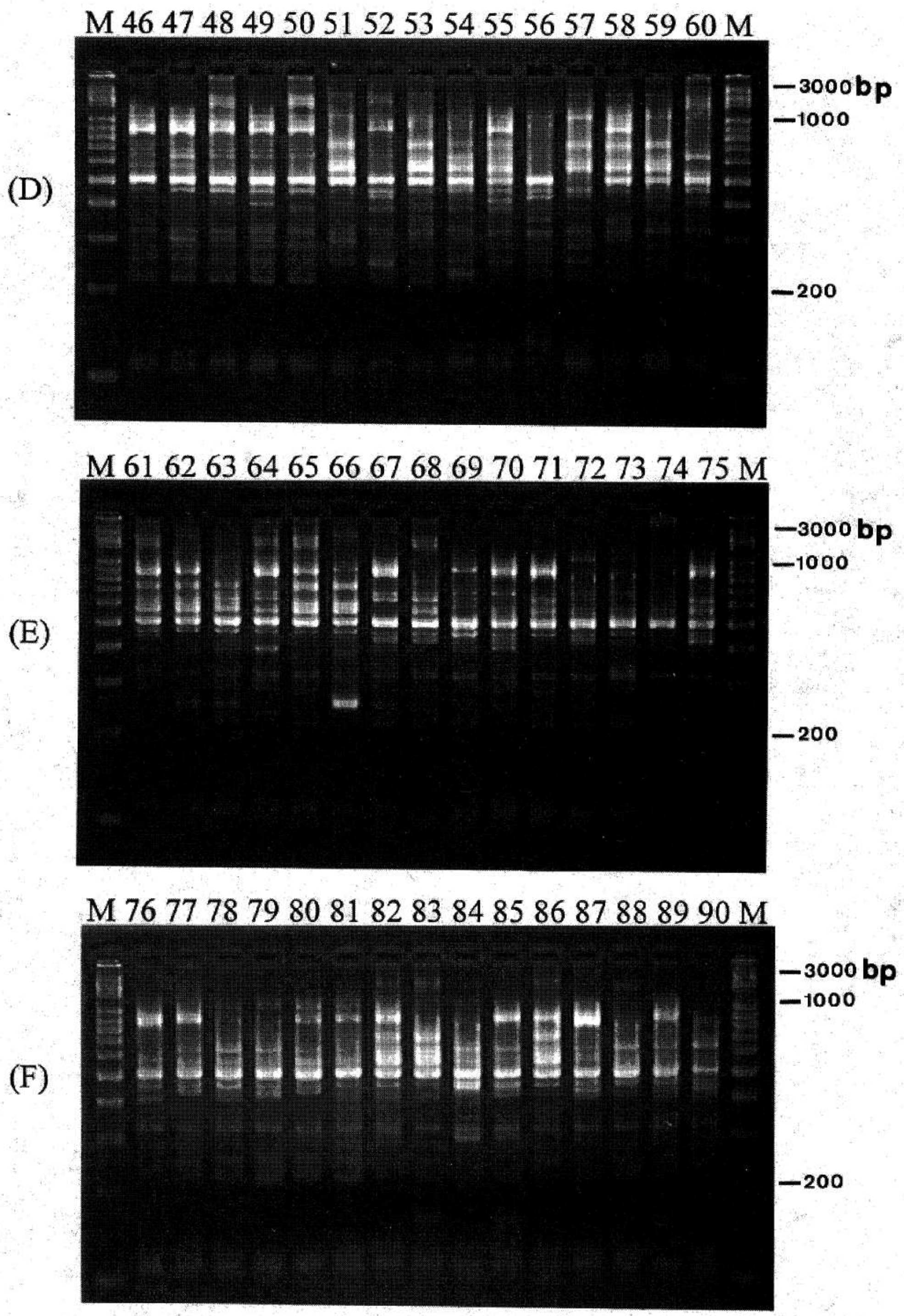


圖 4. 番椒 90 品系（品系代碼詳見表 1），以 SCRI1418 爲引子之 ISSR 圖譜(A～F)

Fig.4. ISSR profiles (A~F) generated by primer SCRI1418 and resolved by 3% MetaPhor agarose gel. Numbers on top refer to the accessions listed in Table 1.

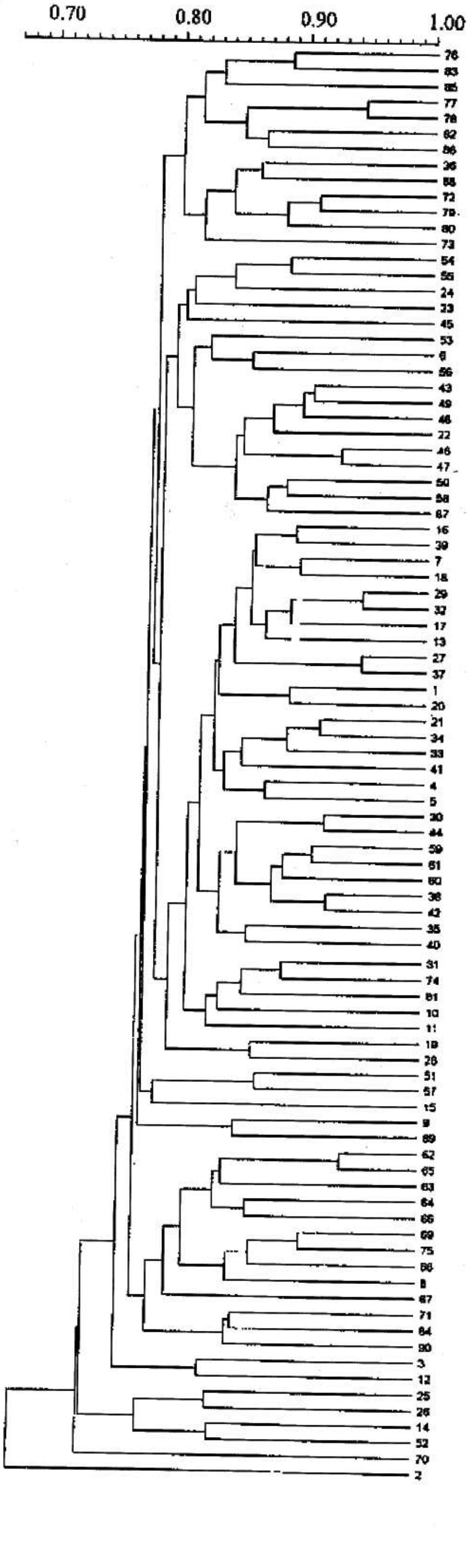


圖 5. 番椒 90 品系之 ISSR 圖譜，經 UPGMA Dice's 計算之相似性樹狀圖 (品系代碼詳見表 1)

Fig. 5. Dendrogram illustrating genetic relationship among 90 pepper accessions, Generated by UPGMA cluster analysis calculated from 165 ISSR markers produced by five primers. The scale on the top is Dice's coefficient of similarity (Numbers on right side of dendrogram refer to accassions list in Table 1)

誌　謝

本試驗承蒙亞洲蔬菜研究發展中心提供番椒種原材料，及台灣大學農藝系林順福博士提供 ISSR primers. 謹致謝忱。

引用文獻

1. Akkaya, M.S., A.A. Bhagwat, and P.B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics, 132:1131-1139.
2. Chaparro J. X., D. J. Werner, D. O'Malley, and R. R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. Theor. Appl. Genet.87: 805-4.
3. Charterers Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson, and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor. Appl. Genet. 92:442-447.
4. Condit, R., and S.P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. Genome, 34: 66-71.
5. Conicella, C., A. Errico, and F. Saccardo. 1989. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annuum*. Genome 33: 279-282.
6. Demoke, T., D. R. Lynch, L.M. Kawchuk, G. C. Kozub, and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Reports 15:662-667.
7. Kantety R.V., X. Zeng, J.L. Bennetzen, and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding. 1: 365-373.
8. Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman, and B. A. Schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85:190-196.
9. Mailer, R. J., R. Scarth, and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers Theor. Appl. Genet.87: 697-704.
10. Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A. 76:5269-5273.
11. Oard, J. H., and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR . Plant Mol. Bio. Rep. 10:236-241.
12. Prince, J. P.,K. L. Vincent, A. Carmichael, R. B. James, and M. K. Molly. 1995. A survey of DNA polymorphism with the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome. 38:224-231.
13. Ratnaparkhe M.B., D.K. Santra, A. Tullu, and F.J. Muehlbauer. 1998. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. Theor. Appl. Genet. 96:348-353.
14. Rongwen J., M.S. Akkaya, and A.A. Bhagwat. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90:43-48.
15. Scovel G., H. Ben-Meir, M. Ocadis, H. Itzhaki, and A. Vainsein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. Theor. Appl. Genet. 96:117-122.
16. Taramino T.,and S. Tingey. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. Genome, 39:227-287.
17. Tautz, D.,and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 12:4127-4138.
18. Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong, and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandom DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88:1-6.
19. Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acid Res. 19: 5275-5279.
20. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531-6535.
21. Wollf K., E. Zeitkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447.
22. Wu, K.S., and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice. Mol. Gen. Genet, 241:225-235.

Comparison on Microsatellite DNA and Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Germplasm Identification of *Capsium annuum*[1]

Jau - Jueh Wang[2] and Ming - Jen Fan[2]

Summary

Ninety accessions of pepper (*Capsicum annuum*) germplasm collected from Europe, Asia, and Australia etc, were investigated and compared by using microsatellite DNA (inter-simple sequence repeat, ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Objectives were to assess genetic diversity and intraspecific polymorphism among pepper germplasm from 16 original countries. The results indicated that both two molecular markers had high degree plymorphism. There were 151 polymorphic bands produced by five primers using ISSR while 130 polymorphic bands produced by RAPD, and that also allowed 90 accessions to be distinguished. One of the primers of ISSR "SCRI1418" showed more useful for fingerprinting of all the 90 accessions. Analysis of similarity by UPGMA (unweighted pair-group mean arithmetic) using the markers of ISSR and RAPD revealed results of both methods had closely related. The similarity coefficient calculated from the germplasm of Australia analysed by ISSR had the lowest value (0.68) , while the Italy's had the highest value (0.82) . The similarity coefficient of Australia generated by RAPD also had the lowest value (0.67) , and the highest was existed in Italy and Turkey. It is suggested that both ISSR and RAPD markers, in addition to being simple and time efficient, provides for rapid identification polymorphism within species of *Capsicum annuum*.

Key words : Microsatellite DNA, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Germplasm Identification, Pepper (*Capsicum annuum*.)

---

1. Contribution No. 1952 from Taiwan Agriculture Research Institute.
2. Respectitvely , Assistant Agronomist, Research Fellow and Head, Crop Genetic Resources Laboratory, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.